

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : <b>B01J 13/16</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 94/04261</b> (43) Date de publication internationale: 3 mars 1994 (03.03.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00792 (22) Date de dépôt international: 4 août 1993 (04.08.93)		(81) Etats désignés: CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 92/10173 20 août 1992 (20.08.92) FR			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): COLETICA [FR/FR]; 32, rue S.-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant ( <i>US seulement</i> ): LEVY, Marie-Christine [FR/FR]; 18 ter, rue Houzeau-Muiron, F-51100 Reims (FR). (74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).			
(54) Title: UTILIZATION OF A TRANSACYLATION REACTION BETWEEN AN ESTERIFIED POLYSACCHARIDE AND A POLYAMINATED OR POLYHYDROXYLATED SUBSTANCE FOR FABRICATING MICROPARTICLES, MICROPARTICLES THUS OBTAINED, METHODS AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM (54) Titre: UTILISATION D'UNE REACTION DE TRANSACYLATION ENTRE UN POLYSACCHARIDE ESTERIFIE ET UNE SUBSTANCE POLYAMINEE OU POLYHYDROXYLEE POUR LA FABRICATION DE MICROPARTICLES, MICROPARTICLES AINSI REALISEES, PROCEDES ET COMPOSITIONS EN CONTENANT			
(57) Abstract The invention relates to microparticles, particularly microcapsules and their fabrication method. Said microparticles, and particularly said microcapsules, are characterized in that they have a wall made of the product obtained from the reaction between a polysaccharide carrying esterified carboxylic groups and a polyaminated or polyhydroxylated substance, particularly through a transacylation reaction. Said microparticles or said microcapsules are useful for the fabrication of cosmetic, pharmaceutical or food product compositions.			
(57) Abrégé L'invention concerne des microparticules, en particulier des microcapsules et leur procédé de fabrication. Ces microparticules, en particulier ces microcapsules, sont caractérisées en ce qu'elles présentent une paroi constituée du produit de réaction entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée ou une substance polyhydroxylée, notamment par l'intermédiaire d'une réaction de transacylation. Ces microparticules ou ces microcapsules sont utiles pour la fabrication de compositions cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures  
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Utilisation d'une réaction de transacylation entre un polysaccharide estérifié et une substance polyaminée ou polyhydroxylée pour la fabrication de microparticules, microparticules ainsi réalisées, procédés et compositions en contenant.

5        La présente invention concerne essentiellement l'utilisation d'une réaction de transacylation entre un polysaccharide estérifié et une substance polyaminée ou polyhydroxylée pour la fabrication de microparticules, les microparticules, leurs procédés de fabrication ainsi que des compositions en comportant application.

10      Plus précisément, la présente invention concerne essentiellement l'utilisation d'une réaction de transacylation entre d'une part un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, et d'autre part soit une substance polyaminée, en particulier une protéine, soit une substance polyhydroxylée, en particulier un polysaccharide, pour la fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, les microparticules ainsi réalisées, les procédés de fabrication de telles microparticules, en particulier des microcapsules, et les compositions en contenant, telles que compositions cosmétiques, pharmaceutiques, alimentaires, enzymatiques, de réactifs ou de diagnostics.

20      La mise au point de microparticules, en particulier de microcapsules biocompatibles, présente un grand intérêt notamment dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et alimentaire. Chargées d'une ou plusieurs substances actives, ces vésicules peuvent en effet permettre de masquer un goût ou une odeur désagréables, d'augmenter la stabilité des substances encapsulées, d'en prévenir l'évaporation, d'en assurer la libération prolongée *in situ*. Si la membrane résiste au milieu gastrique, les microparticules, en particulier les microcapsules, peuvent en outre protéger la substance active contre une dégradation dans l'estomac, ou protéger la muqueuse gastrique contre un effet irritant.

25      De telles microcapsules sont susceptibles d'être administrées par des voies diverses, telles que la voie orale, l'application sur la peau ou les muqueuses, ou la voie parentérale.

30      Parmi les divers matériaux candidats, les protéines et les polysaccharides sont les plus étudiés. Divers procédés ont été ainsi décrits pour la préparation de microcapsules à partir de protéines ou de polysaccharides ou d'associations de protéines et de polysaccharides. Certains procédés comportent un premier stade d'émulsification de la solution aqueuse de protéine ou de polysaccharide au sein d'une phase hydrophobe, suivi d'un stade de réticulation à l'aide d'un agent bi-

fonctionnel tel que les dichlorures d'acide. On peut citer par exemple le document FR-A-2 444 497 Mars, ou encore le document FR-A-2 527 438 CNRS dans lequel la réticulation interfaciale est appliquée à des mélanges de protéines et de polysaccharides.

5 Pour encapsuler des liquides hydrophobes émulsionnés comme phase dispersée dans une solution aqueuse de protéine ou de polysaccharide, les procédés existants consistent généralement soit à utiliser un chauffage de l'émulsion si la protéine est dénaturable à la chaleur (par exemple document US 3 137 631 Soloway), soit à incorporer un agent réticulant à la phase hydrophobe (document 10 US 4 138 362 Vassiliades).

Par ailleurs, les procédés dits de coacervation complexe sont bien connus de l'homme de l'art. Ils sont applicables notamment à des solutions aqueuses d'une protéine et d'une substance polyanionique comme par exemple un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques. La substance à encapsuler est dispersée dans la phase aqueuse soit sous forme d'un solide, soit sous forme de gouttelettes d'un liquide non miscible. Le principe est d'acidifier la solution aqueuse de manière à amener le pH à une valeur telle que la protéine soit chargée positivement et forme avec la substance polyanionique un complexe électriquement neutre, lequel se dépose sur la phase dispersée à encapsuler.

20 Les procédés utilisant les agents de réticulation bifonctionnels présentent l'inconvénient d'imposer des lavages répétés des microcapsules obtenues, de manière à éliminer totalement l'agent réticulant en excès. En outre, la réaction chimique de réticulation provoque d'importantes altérations de la structure des protéines. Pour des applications pharmaceutiques, de telles altérations sont à éviter 25 car elles peuvent être à l'origine de propriétés immunogènes des microparticules. De même, si l'on cherche à préserver les propriétés biologiques spécifiques de la protéine utilisée pour la préparation des microparticules telles que des propriétés enzymatiques (enzyme immobilisée) ou des propriétés de transport de l'oxygène (hémoglobine), on cherchera à minimiser toute dénaturation de la protéine pouvant 30 diminuer son activité. Cet objectif ne peut évidemment pas être atteint avec les procédés utilisant la dénaturation thermique de protéines, procédés qui par ailleurs ont l'inconvénient de ne pas pouvoir s'appliquer à des substances thermolabiles.

Les procédés de coacervation complexe sont limités dans leurs applications : ils ne peuvent être appliqués qu'à l'encapsulation de substances insolubles dans l'eau ou de liquides non miscibles à l'eau. En outre, la paroi des microcapsules n'impliquant pas de liaisons covalentes entre la protéine et la substance 35

polyanionique, un traitement de consolidation est nécessaire, comme par exemple un traitement à l'aide d'un agent réticulant.

Plusieurs brevets (GB-A-768 309 Henkel ; GB-A-962 483 AGFA) décrivent la formation d'un film solide et thermostable par alcalinisation d'une solution aqueuse contenant d'une part un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés désigné ci-après par "polysaccharide estérifié" tel que l'alginate de propylèneglycol (PGA), d'autre part une diamine ou une protéine. La réaction entre les groupements ester du polysaccharide estérifié et les groupements aminés de la diamine ou de la protéine conduit à la formation de liaisons amide. Le mécanisme de la réaction implique une migration d'acyles en milieu alcalin dans le sens O vers N, le groupement aminé provoquant une substitution nucléophile de l'ester, avec libération de propane-diol-1,2 (Mc Kay J.E., Stainsby G., Wilson E.L., Carbohydr. Polym., 5, 223-236, 1985 ; Stainsby G., Food Chem., 6, 3-14, 1970). Cette réaction est sous la dépendance étroite du pH de la phase aqueuse : le système doit être alcalinisé de manière contrôlée et pendant un temps précis, faute de quoi le réseau formé ne tarde pas à se détruire par hydrolyse de liaisons glycosidiques du polysaccharide.

D'autre part, les documents de la technique antérieure indiquent la possibilité d'obtenir des films solides par alcalinisation de solutions renfermant à la fois de l'alginate de propylèneglycol (PGA) et un composé polyhydroxylé tel que l'amidon, la carboxyméthylcellulose ou l'alcool polyvinyle (Document BP 1 135 856). Ce phénomène, qui se produit également dans une certaine mesure avec le PGA seul, est attribué à une réaction de transacylation (transestérification) entre le PGA et le dérivé polyhydroxylé.

Ces phénomènes n'avaient jamais été encore appliqués à des émulsions.

Si l'on se base sur les conditions décrites dans la littérature, c'est-à-dire en utilisant un polysaccharide estérifié tel que le PGA, à degré de substitution élevé (>50 %), un pH compris entre 9,3 et 10,5 et un temps d'alcalinisation de 15 min suivi d'une neutralisation par ajout d'un acide, et si l'on tente d'appliquer directement la réaction à une émulsion d'une solution aqueuse alcaline contenant à la fois du PGA d'une part, et d'autre part par un composé polyaminé tel qu'une protéine ou un composé polyhydroxylé tel qu'un polysaccharide, utilisée comme phase dispersée au sein d'une phase hydrophobe, il n'est pas possible d'obtenir des microparticules ou des microcapsules pour aucune concentration de PGA et de

composé polyaminé ou polyhydroxylé. La phase aqueuse alcaline contenant les deux composés en solution se prend très rapidement en masse si le pH est suffisamment élevé, rendant toute émulsification dans une phase hydrophobe impossible, tandis qu'il ne se forme pas de film stable pour les valeurs de pH inférieures.

- 5 Il faut donc émulsionner la phase aqueuse neutre contenant les deux biopolymères, utilisée comme phase dispersée, au sein d'une phase hydrophobe, utilisée comme phase dispersante, puis déclencher la réaction de transacylation au sein de l'émulsion. Toutefois, on se trouve devant le problème de faire en sorte que l'agent alcalin ajouté à l'émulsion diffuse à travers la phase hydrophobe et parvienne  
10 jusqu'à l'intérieur des gouttelettes de phase aqueuse dispersée. L'ajout à l'émulsion d'une solution alcaline aqueuse ne permet pas d'atteindre ce résultat. Le même problème se pose pour la neutralisation du milieu par acidification en fin de réaction, qui ne peut être réalisée par ajout d'une solution aqueuse acide.

De même, si l'on tente d'appliquer le phénomène à une émulsion d'une  
15 phase hydrophobe utilisée comme phase dispersée dans une phase aqueuse utilisée comme phase dispersante et constituée d'une solution alcaline de PGA et d'un composé polyaminé tel qu'une protéine ou d'un composé polyhydroxylé tel qu'un polysaccharide, il n'est pas possible d'obtenir des microcapsules, pour aucune concentration de PGA et de composé polyaminé ou polyhydroxylé. La phase  
20 aqueuse alcaline se prend en masse si le pH est suffisamment élevé, ou bien ne laisse pas déposer de film stable sur les gouttelettes hydrophobes dispersées pour les pH inférieurs.

Le document GB-A-962 483 AGFA décrit une réaction (esters de l'acide alginique), en particulier des esters de glycol avec des amines telles que  
25 l'hexaméthylènediamine, des protéines pour la formation d'un agent de liaison de couche photographique. Ce document ne concerne pas le domaine technique de la fabrication des microcapsules qui est un domaine technique totalement différent de celui des couches photographiques.

De même, le document GB-A-763 309 Henkel concerne un procédé  
30 de production d'amides d'acide alginique et en particulier d'amides formateurs de gel à partir de cet acide pour réaliser une gélification et un revêtement de surface, application qui apparaît être l'application essentielle des esters ou des dérivés de l'acide alginique.

Le document GB-A-1 135 856 est relatif à un procédé de  
35 modification des alginates d'alkylèneglycol pour la formation d'agents de mise en suspension, d'agents liants et d'adhésifs en particulier pour lier des matériaux en

poudre ou granules, la formation de revêtement de surface résistant à l'eau, des gelées élastiques (page 2, ligne 121 à la page 3, ligne 104) ou dans les produits cosmétiques pour utiliser cette capacité liante. Ce document ne concerne donc également en aucune façon le domaine technique de la fabrication de microcapsules.

La présente invention a pour but de préparer des microparticules, de préférence des microcapsules, stables, à partir de composés polyaminés et en particulier à partir de protéines, ou à partir de composés polyhydroxylés et en particulier à partir de polysaccharides, à température du laboratoire, sans agent réticulant bifonctionnel, et renfermant soit une phase hydrophile, soit une phase hydrophobe selon que l'on préparera au départ, soit une émulsion d'une phase hydrophile utilisée comme phase dispersée dans un liquide hydrophobe comme phase dispersante, soit une émulsion d'une phase hydrophobe utilisée comme phase dispersée dans un liquide aqueux utilisé comme phase dispersante.

La présente invention a encore pour but de préparer des microparticules, de préférence des microcapsules, à partir de protéines en limitant les altérations de leur structure de manière à obtenir une biocompatibilité améliorée et, dans le cas où la protéine est douée d'une activité biologique spécifique, de manière à préserver cette activité.

La présente invention a encore pour but de résoudre le problème de l'alcalinisation des gouttelettes de la phase aqueuse neutre contenant à la fois un polysaccharide estérifié, tel que le PGA d'une part et le composé polyhydroxylé ou polyaminé d'autre part, une fois dispersées au sein d'une phase hydrophobe à l'état d'émulsion, puis de leur neutralisation par acidification en fin de réaction, au sein de l'émulsion.

La présente invention a également pour but, dans le cas d'une émulsion d'un liquide hydrophobe utilisé comme phase dispersée dans une phase aqueuse contenant à la fois le polysaccharide estérifié d'une part, et le composé polyhydroxylé ou polyaminé d'autre part, de réaliser une alcalinisation localisée autour des gouttelettes de la phase hydrophobe et non dans la totalité du volume de la phase aqueuse dispersante, de manière à déclencher la réaction de transacylation sélectivement à l'interface de l'émulsion.

La présente invention a encore pour but de préparer des microparticules, de préférence des microcapsules, à partir d'un polysaccharide estérifié d'une part, et de composés polyaminés ou polyhydroxylés solubles dans des liquides hydrophobes d'autre part, en réalisant des solutions séparées des réactants dans des

phases non miscibles, et en déclenchant au moment voulu la réaction de transacylation à l'interface d'une émulsion selon les principes exposés ci-dessus.

La présente invention a encore pour but de résoudre les problèmes techniques ci-dessus énoncés, avec l'utilisation de procédés de fabrication simples

- 5 utilisables à l'échelle industrielle et permettant en outre de régler la taille des microparticules, de préférence des microcapsules, en particulier dans une plage de dimensions allant de moins de 1  $\mu\text{m}$  à 5 000  $\mu\text{m}$ .

Selon la présente invention, on a découvert de manière parfaitement inattendue que l'alcalinisation *in situ* des gouttelettes aqueuses dispersées au sein

- 10 d'une phase hydrophobe à l'état d'émulsion pouvait être réalisée de manière extrêmement simple par addition à l'émulsion d'une solution d'un agent alcalin dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse. La réaction de transacylation peut ainsi être déclenchée après l'étape d'émulsification. Après réaction, la neutralisation est ensuite réalisée de la même manière par ajout au milieu réactionnel d'une solution d'un acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse. Des sphérides microscopiques peuvent être ainsi isolées, constituées d'une substance polyaminée telle qu'une protéine, ou d'une substance polyhydroxylée telle qu'un polysaccharide, directement associée par liaisons covalentes à un polysaccharide polycarboxylique sans aucun autre réactif ajouté.

- 15 20 On a de même découvert de manière inattendue que l'addition à une phase hydrophobe d'un agent alcalin en solution dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse permettait, une fois ce mélange émulsionné comme phase dispersée dans une phase aqueuse neutre contenant à la fois le polysaccharide estérifié d'une part, et le composé polyhydroxylé ou polyaminé d'autre part, une diffusion d'ions alcalins à l'interface, capable de déclencher *in situ* la réaction de transacylation et la formation d'une membrane autour des gouttelettes hydrophobes, et que les microparticules, de préférence les microcapsules, ainsi formées puis neutralisées par addition d'une solution d'un acide dans un liquide organique miscible à l'eau ou dans l'eau, pouvaient être aisément séparées de la phase dispersante sans problème de prise en masse.

- 25 30 35 Enfin, on a découvert que des microparticules, de préférence des microcapsules, pouvaient être préparées par une réaction de transacylation interfaciale à partir d'une part d'un polysaccharide estérifié tel que le PGA dissous dans la phase aqueuse, et d'autre part d'un composé polyhydroxylé tel qu'un dérivé cellulose, ou polyaminé, tel que l'hexaméthylènediamine, dissous dans une phase hydrophobe. La phase aqueuse peut être utilisée comme phase dispersée ou comme

phase dispersante. Toutefois, si on alcalinise la solution de polysaccharide estérifié avant le stade d'émulsification, des réactions d'hydrolyse des groupements ester et de transestérification entre chaînes polysaccharidiques vont diminuer le nombre de groupements ester disponibles pour la réaction, ce qui n'est pas favorable à la formation de la membrane, tout en produisant une augmentation de viscosité de la phase aqueuse gênant l'émulsification.

On devra donc utiliser une solution aqueuse neutre du polysaccharide estérifié et, une fois l'émulsion obtenue en présence de la phase hydrophobe, déclencher une alcalinisation à l'interface. On a découvert que ce problème pouvait être aisément résolu en utilisant les procédés exposés plus haut. En effet, dans le cas de l'utilisation de la phase aqueuse comme phase dispersée, on a pu vérifier que l'alcalinisation *in situ* des gouttelettes aqueuses dispersées peut être réalisée de la même manière par addition à l'émulsion d'une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse. Les microparticules, de préférence les microcapsules, sont neutralisées ensuite selon le même procédé à l'aide d'une solution d'un acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse. De même, dans le cas où la phase hydrophobe est utilisée comme phase dispersée, on a constaté que l'on pouvait très facilement obtenir au sein de l'émulsion une diffusion d'ions alcalins en périphérie des gouttelettes dispersées, par addition à la phase hydrophobe d'une solution d'un agent alcalin dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse. De cette manière on déclenche une réaction de transacylation interfaciale. Les microparticules, de préférence les microcapsules formées, sont ensuite neutralisées par ajout au milieu réactionnel d'une solution d'un acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ou dans l'eau.

C'est sur la base de cette découverte, totalement inattendue pour l'homme de l'art, que la présente invention a été réalisée. L'invention représente un progrès technique déterminant pour l'homme de l'art, compte tenu de ce que les microparticules, de préférence les microcapsules obtenues, qui résultent de l'établissement de liaisons covalentes par la réaction de transacylation, sont parfaitement stables alors que leur constitution ne fait intervenir que des substances biocompatibles, à l'exclusion de tout agent réticulant bifonctionnel. Elles pourront ainsi trouver de nombreuses applications dans divers domaines tels que la pharmacie, la cosmétique et l'industrie alimentaire. La possibilité d'incorporer aux microparticules, de préférence aux microcapsules, aussi bien des substances hydrophobes que des substances hydrophiles, constitue un autre avantage important de l'invention. Ainsi des microparticules, de préférence des micro-

capsules, chargées d'huiles telles que les huiles essentielles, ou de solutions huileuses de substances actives, peuvent être aussi aisément préparées que des microparticules, de préférence des microcapsules, renfermant des solutions aqueuses ou même des suspensions ou des émulsions à phase continue aqueuse. En 5 outre, la composition des microparticules, de préférence des microcapsules, pourra être choisie par exemple de manière à obtenir ou non une digestion par les protéases, en utilisant une polyamine telle qu'une protéine ou une substance polyhydroxylée telle qu'un polysaccharide respectivement pour réagir avec le polysaccharide estérifié. Enfin, les conditions ménagées du procédé n'entraînent 10 pas de dénaturation importante des protéines, de sorte qu'il peut être appliqué à des enzymes sans suppression de leur activité, ce qui donne un nouveau type d'enzymes immobilisées.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un réaction de transacylation entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée, en particulier un 15 polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, ou une substance polyhydroxylée, en particulier un polysaccharide, pour la fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules. De préférence, ces microparticules, en particulier ces microcapsules, contiennent un principe actif 20 cosmétique, pharmaceutique, alimentaire, une protéine douée d'une activité biologique telle qu'une enzyme ou l'hémoglobine.

Selon un deuxième aspect, la présente invention a également pour objet des microparticules, en particulier des microcapsules, caractérisée en ce qu'elles présentent une paroi constituée du produit de réaction entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, ou une substance polyhydroxylée, telle qu'un polysaccharide. 25

Selon une variante de réaction particulière, ces microparticules, en 30 particulier ces microcapsules, présentent une paroi constituée du produit de réaction entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, en présentant ainsi des liaisons covalentes amides impliquant les groupes amine de la polyamine et les groupements carboxyliques du polysaccharide estérifié. Avantageusement, les proportions 35 du polysaccharide estérifié par rapport à la polyamine, telle qu'une protéine,

ou un polysaccharide tel que le chitosan, peuvent varier de 0,4 % à 60 % en poids. Dans le cas particulier de l'emploi d'une diamine comme polyamine, une proportion particulière de cette diamine par rapport au polysaccharide estérifié peut être plus précisément comprise entre 5 et 30 % en poids.

5 Selon une autre variante de réalisation, les microparticules, en particulier les microcapsules, sont caractérisées en ce qu'elles présentent une paroi constituée du produit de réaction d'un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et d'une substance polyhydroxylée, par exemple un polysaccharide, par l'intermédiaire de liaisons covalentes ester impliquant les 10 groupements carboxyliques du polysaccharide estérifié et les groupements hydroxyles du composé polyhydroxylé. Avantageusement, les proportions de polysaccharide estérifié par rapport aux composés polyhydroxylés peuvent varier de 5 % à 300 % en poids.

15 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, ces microparticules, en particulier ces microcapsules, contiennent un principe actif cosmétique, pharmaceutique, alimentaire, ou une protéine à activité biologique telle qu'une enzyme ou l'hémoglobine, ou encore des bulles de gaz tel que l'air.

20 Selon un troisième aspect, la présente invention concerne un procédé de fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :

25 a) on prépare une solution aqueuse neutre renfermant d'une part un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, et d'autre part soit une substance polyaminée comme par exemple un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, soit une substance polyhydroxylée comme par exemple un polysaccharide ;

b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel le polysaccharide estérifié et la substance polyaminée ou polyhydroxylée sont essentiellement insolubles ;

30 c) on mélange le liquide hydrophobe et la solution aqueuse pour former une émulsion ;

d) on ajoute à l'éulsion une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ;

35 e) après une période de temps prédéterminée nécessaire pour réaliser une réaction de transestérification, en formant ainsi des microparticules, en particulier des microcapsules, on réalise une neutralisation de l'éulsion, de préférence en ajoutant à l'éulsion une solution d'une substance acide dans un liquide

organique miscible à la phase aqueuse ; ce qui neutralise et stabilise les micro-particules, en particulier les microcapsules formées.

Selon une variante de réalisation, on forme une émulsion de la solution aqueuse comme phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue.

Selon un autre mode de réalisation, le liquide hydrophobe forme la phase dispersée, dans ce cas, on ajoute dans le liquide hydrophobe une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse, puis cette phase hydrophobe est dispersée dans la solution aqueuse neutre précitée formant la phase continue de manière à former l'émulsion précitée, ce qui permet de laisser se développer la réaction de transacylation à la surface des gouttelettes dispersées par diffusion des ions alcalins jusqu'à l'interface.

Ainsi, selon encore un quatrième aspect, la présente invention concerne un procédé de fabrication de microparticules, en particulier de micro-capsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :

a) on prépare une solution aqueuse neutre d'un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés ;

b) on prépare une solution hydrophobe d'une substance polyaminée telle que par exemple un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, une diamine, ou d'une substance polyhydroxylée telle que par exemple un polysaccharide, l'hydroxypropylcel-lulose, dans un liquide hydrophobe, dans lequel le polysaccharide estérifié est essentiellement insoluble, puis on ajoute à cette solution une solution d'un agent alcalin dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ;

c) on forme une émulsion de ce mélange utilisé comme phase dispersée dans la solution aqueuse neutre du polysaccharide estérifié formant la phase continue, et on laisse se développer la réaction de transacylation à la surface des gouttelettes dispersées, par diffusion des ions alcalins jusqu'à l'interface ;

d) après réaction pendant une période de temps prédéterminée, on ajoute au milieu réactionnel une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ou dans l'eau, de manière à neutraliser et ainsi stabiliser les microparticules, en particulier les microcapsules.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne encore un procédé de fabrication de microparticules, en particulier de micro-capsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :

- a) on prépare une solution aqueuse neutre d'un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés.
- b) On prépare une solution d'une substance polyaminée ou d'une substance polyhydroxylée dans un liquide hydrophobe, dans lequel le polysaccharide estérifié est essentiellement insoluble.
- c) On forme une émulsion de la solution aqueuse utilisée comme phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue.
- d) On ajoute à l'émulsion une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse, de manière à déclencher la réaction interfaciale de transacylation et former ainsi des microparticules, en particulier des microcapsules.
- e) Après réaction, on ajoute à l'émulsion une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse, de manière à neutraliser et ainsi stabiliser les microparticules, en particulier les microcapsules.

15 Avantageusement, le procédé précité peut encore comprendre une étape complémentaire de séparation des microparticules, en particulier des microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué un ou plusieurs lavages.

Selon une caractéristique avantageuse des procédés de fabrication  
20 selon l'invention, les microparticules, en particulier les microcapsules, une fois séparées du milieu réactionnel peuvent être placées dans une solution calcique aqueuse ou alcoolique, de manière à déclencher une réaction entre les groupes fonctionnels du polysaccharide estérifié et les ions calcium. Il est bien connu qu'une telle réaction engendre une structure en réseau susceptible de se comporter comme un système matriciel. La structure particulière des microparticules, en particulier des microcapsules obtenues, est ainsi susceptible de permettre un piégeage plus efficace et/ou une diffusion ralentie des substances encapsulées ou emprisonnées dans la matrice.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention qui est bien  
30 entendu applicable à l'un quelconque des aspects de l'invention, la substance ou le composé polyaminé peut être une protéine, partiellement hydrolysée ou non, greffée ou non de longue chaîne hydrocarbonée. Par longue chaîne hydrocarbonée, on entend des chaînes comportant de 10 à 30 atomes de carbone. La substance ou composé polyaminé peut également être choisie parmi une protéine hydrophile,  
35 c'est-à-dire soluble dans l'eau ou dispersible dans l'eau, contenant des groupements amine libres.

Il n'est pas essentiel que les matières protéiques utilisées dans la réaction soient des protéines pures. Elles peuvent être utilisées sous la forme de mélanges naturels ou non contenant des protéines hydrophiles, comme par exemple le lait, ou des mélanges d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes.

5 Des exemples de protéines qui peuvent être utilisées dans l'invention et qui remplissent les conditions qui consistent à être hydrophiles ou bien qui peuvent être traitées pour être hydrophiles sont les albumines comme la sérumalbumine, l'ovalbumine, l'alpha-lactalbumine, des globulines, le fibrinogène, la caséine, des glutélines qui de préférence auront été dégradées, des scléroprotéines solubilisées, 10 le collagène, l'atélocollagène, la gélatine, l'hémoglobine, des enzymes telles que la catalase.

15 Comme exemples de mélanges contenant des protéines hydrophiles, on peut citer le lait entier ou écrémé totalement ou partiellement, le lait en poudre, le lait condensé, les protéines du lactosérum, l'oeuf entier, le jaune d'oeuf, les mélanges d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes.

Dans le cadre de l'invention, la substance polyaminée peut être un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, une diamine telle qu'une alkylènediamine et, de préférence ayant de 2 à 6 atomes de carbone comme l'éthylènediamine, la triméthylènediamine, la tétraméthylènediamine, la 20 pentaméthylènediamine, l'hexaméthylènediamine, une diamine comprenant un noyau aromatique telle que la m-phénylènediamine, la p-phénylènediamine, une alkylènopolyamine telle que la tétraéthylènepentamine, une amine comportant un atome d'azote intégré dans un cycle comme la pipérazine, ces exemples étant cités à titre illustratif et non limitatif.

25 Selon une autre caractéristique avantageuse de l'invention, applicable pour l'un quelconque des aspects de l'invention, le polysaccharide estérifié est un polysaccharide hydrophile porteur de nombreux groupements carboxyliques, lesquels sont estérifiés dans une proportion au moins égale à 50 %, soit naturellement, soit par modification chimique. Selon une caractéristique préférée, 30 l'ester polysaccharidique est choisi parmi l'alginate de propylèneglycol et les pectines.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la concentration en ester polysaccharidique dans la phase aqueuse est comprise entre 0,4 % et 5 % p/v, et encore mieux de 0,7 à 2 %, et encore de 35 préférence voisine de 1 %.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la concentration en protéine ou polyamine dans la phase aqueuse est comprise entre 0,2 % et 35 %.

Selon une autre caractéristique avantageuse de l'invention applicable pour l'ensemble des aspects de l'invention, la substance polyhydroxylée susceptible de réagir avec le polysaccharide estérifié est un polysaccharide ou dérivé de polysaccharide tel que l'amidon ou l'amidon partiellement hydrolysé, l'hydroxyéthylamidon, le carboxyméthylamidon, l'alginate de sodium, la gomme guar, la gomme arabique, la gomme adragante, divers dérivés de cellulose tels que l'hydroxypropylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'éthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose.

Selon une autre caractéristique avantageuse de l'invention applicable pour l'ensemble des aspects de l'invention, la substance polyhydroxylée susceptible de réagir avec le polysaccharide estérifié est un polyalcool tel que l'alcool polyvinyle, un alkylèneglycol, en particulier un C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alkylèneglycol, par exemple l'éthylèneglycol, le 1,4-butanediol, l'hexaméthylèneglycol, le glycérol, ces polyalcools étant cités à titre illustratif et sans limitation.

La phase aqueuse peut être constituée soit d'eau pure, soit d'un tampon de pH compris entre 5,9 et 8, de préférence entre 6,8 et 7,5.

Comme liquide hydrophobe dans lequel la protéine ou la polyamine et l'ester polysaccharidique sont insolubles, on peut utiliser tout solvant décrit dans les documents précédents. De préférence, on utilise le chloroforme, le dichlorométhane, le cyclohexane, l'huile de paraffine, le myristate d'isopropyle ou encore des glycérides naturels ou synthétiques, purs ou en mélanges, des huiles végétales par exemple l'huile d'arachide, l'huile d'olive, l'huile de colza, des esters d'acides gras et de divers alcools comme par exemple les oléates de méthyle ou d'éthyle, seuls ou en mélanges.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, l'émulsion est réalisée en présence d'un tensioactif. Quand la phase aqueuse est utilisée comme phase dispersée, on pourra utiliser par exemple un ester de sorbitanne ou une lécithine, incorporés à la phase hydrophobe. Quand la phase hydrophobe est utilisée comme phase dispersée, on pourra utiliser par exemple du polysorbate incorporé à la phase aqueuse. Toutefois, un tensioactif n'est pas nécessaire au bon déroulement des procédés selon l'invention et il peut être omis.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, le liquide organique alcalin miscible à la phase aqueuse est une solu-

tion de soude ou de potasse dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, utilisés purs ou renfermant 5 à 10 % d'eau, ou encore un polyol, tel que le glycérol ou un polyéthylèneglycol. Selon une caractéristique préférée, la solution contient entre 0,5 et 2 % p/v de soude dans l'éthanol à 95 %, et encore de préférence une 5 concentration de soude voisine de 2 %.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, le temps pendant lequel un pH alcalin est maintenu pour le développement de la réaction de transacylation est compris entre 5 min et 1 h, de préférence entre 5 min et 30 min, de préférence encore il est de 15 min.

10 Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, le liquide organique acide miscible à la phase aqueuse est une solution d'un acide organique monocarboxylique ou polycarboxylique, porteur ou non de fonctions alcool, comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide succinique, l'acide malique, ou d'un acide minéral comme l'acide 15 chlorhydrique, dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, purs ou renfermant 5 à 10 % d'eau, ou encore dans un polyol, tel que le glycérol ou un polyéthylèneglycol. Selon une caractéristique préférée, la solution acide est constituée d'éthanol à 95 %, contenant entre 1 et 10 % (v/v) d'acide acétique, et de préférence entre 7 et 8 %.

20 Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, le temps de neutralisation des microcapsules, c'est-à-dire le temps d'agitation nécessaire après ajout de la solution acide au milieu réactionnel, est compris entre 5 min et 1 h, de préférence entre 5 min et 30 min, de préférence encore il est de 15 min.

25 Selon le type d'émulsion réalisée et le protocole choisi, on peut introduire dans la phase aqueuse ou dans la phase huileuse un ou plusieurs principes actifs à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion, en particulier une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

On peut également emprisonner une mousse à l'intérieur des microparticules, en particulier des microcapsules. Ainsi par exemple, on peut incorporer des bulles de gaz tel que l'air à une solution aqueuse de protéine et de polysaccharide estérifié en la soumettant à une agitation très vive. On applique ensuite à la mousse le procédé de l'invention en l'utilisant comme phase aqueuse dispersée au sein d'une phase hydrophobe. Après séchage, les microparticules, en particulier les 35 microcapsules, contiennent une multitude de bulles de gaz tel que de l'air

emprisonnées. De telles microparticules, en particulier des microcapsules, trouvent une indication d'emploi dans les méthodes de diagnostic médical par échographie.

Lorsqu'on utilise pour réagir avec le polysaccharide estérifié une protéine douée d'une activité biologique telle qu'une enzyme ou l'hémoglobine, les 5 microcapsules obtenues selon l'invention peuvent constituer une forme immobilisée d'utilisation facile, notamment dans les domaines des biotechnologies, des bioréactifs ou de la thérapeutique. Ainsi, par exemple, pour le domaine de la thérapeutique, les enzymes immobilisées ou encapsulées trouvent des indications d'emploi intéressantes en thérapie substitutive, par voie orale dans les insuffisances 10 en enzymes digestives, par voie parentérale pour le traitement des maladies liées à des déficiences enzymatiques congénitales. Elles sont également utiles dans le cadre du traitement de certaines tumeurs, ou localement pour le traitement des plaies et ulcères, ou même dans des systèmes extracorporels d'épuration sanguine. L'immobilisation a pour effet de protéger l'enzyme contre des agents inactivants 15 divers, d'en ralentir l'attaque par les protéases, d'en diminuer l'immunogénicité. Pour ce qui concerne l'hémoglobine, des microcapsules préparées à partir de cette protéine et ayant conservé ses propriétés oxyphoriques ont des applications comme "hématies artificielles", ou encore en biotechnologie pour l'oxygénéation des bioréacteurs.

20 Enfin, selon un cinquième aspect, la présente invention concerne encore une composition telle qu'une composition cosmétique ou une composition pharmaceutique, ou une composition alimentaire, ou une composition enzymatique, caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules, en particulier des microcapsules, présentant une paroi constituée du produit de 25 réaction d'une substance polyaminée ou polyhydroxylée avec un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, soit par l'intermédiaire de liaisons amide impliquant les groupements amine de la protéine ou de la polyamine d'une part, et d'autre part les groupements carboxyliques du polysaccharide, soit par l'intermédiaire de liaisons ester impliquant d'une part les groupements hydroxyle 30 de la substance polyhydroxylée, et d'autre part les groupements carboxyliques du polysaccharide estérifié.

Diverses variantes de réalisation de cette composition résultent clairement des diverses caractéristiques ou variantes avantageuses des procédés de l'invention décrits selon l'un quelconque des autres aspects précédents, ainsi que de 35 la description suivante faite en référence à de nombreux exemples de réalisation de l'invention donnés à titre illustratif et qui ont donc une portée générale.

Ainsi, pour la réalisation de l'invention, il est clair que lorsqu'on utilise un procédé de fabrication dans lequel on prépare une solution aqueuse contenant un polysaccharide porteur de groupement carboxylique estérifié et une substance polyaminée ou une substance polyhydroxylée, cette substance doit être choisie pour sa capacité de solubilité en solution aqueuse. De même, lorsque dans le cadre d'un procédé de l'invention on prépare une solution hydrophobe d'une substance polyaminée ou polyhydroxylée, celle-ci est choisie pour ses capacités de solubilité en solution hydrophobe, comme cela est bien connu à l'homme de l'art.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre, faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

15 **Exemple 1 selon l'invention**

Fabrication de microparticules de diamètre moyen 150 µm à partir de sérumalbumine humaine (HSA) et d'alginate de propylèneglycol (PGA).

a) Préparation de la phase aqueuse

On prépare, par agitation magnétique de 10 min à température ambiante, une solution dans l'eau distillée renfermant 20 % d'HSA (Centre de Transfusion Sanguine, Strasbourg) et 1 % d'un PGA présentant un taux d'estérification compris entre 80 et 85 % (Kelcoloïd S<sup>®</sup>, KELCO International).

b) Emulsification

On émulsionne 6 ml de cette phase aqueuse utilisée comme phase dispersée dans 40 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % v/v de Span 85<sup>®</sup> comme phase dispersante, par agitation mécanique de 5 min à 2 000 tr/min.

c) Alcalinisation

On ajoute à l'émulsion en agitation 2 ml d'une solution de soude à 2 % p/v dans l'éthanol à 95 % et on laisse la réaction de transacylation se développer pendant 15 min, ce qui produit des microparticules.

d) Acidification

On ajoute au milieu réactionnel en agitation 2 ml d'une solution à 7,6 % v/v d'acide acétique dans l'éthanol à 95 %. L'agitation est encore maintenue pendant 15 min de manière à permettre la neutralisation des microparticules formées.

e) Lavages

Les microparticules sont séparées par centrifugation, puis lavées par remises en suspension dans de l'éthanol à 95 % renfermant 2 % de Tween 20®, puis dans l'éthanol à 95 %, puis dans l'eau distillée.

5 Les microparticules peuvent ensuite congelées et lyophilisées.

On obtient des sphères transparentes de taille moyenne 150 µm. Après lyophilisation, la réhydratation de la poudre obtenue montre que les microparticules sont intactes et reprennent leur forme sphérique.

Essais de stabilité dans divers milieux contenant ou non des protéases

10 Dans des tubes à essais, des prises d'essai de 25 mg de microparticules lyophilisées sont réhydratées par addition de 1 ml d'eau distillée, puis additionnées de 7,5 ml de différents milieux :

– de l'eau distillée

– une solution de pH acide (1,2) additionnée ou non de pepsine (milieu 15 gastrique artificiel, USP XXI)

– une solution de pH légèrement alcalin (7,5), additionnée ou non de trypsine (0,25 % p/v).

20 Les tubes sont incubés à 37°C. La stabilité des microparticules est étudiée par examen microscopique. Le temps de lyse est le temps au bout duquel toutes les microparticules ont disparu du milieu.

Résultats : les microparticules préparées selon l'exemple 1 sont stables plus de 3 j dans l'eau distillée comme dans les solutions de pH 1,2 ou de pH 7,5. Elles sont dégradées par les protéases : en 15 min par la pepsine, en 25 min par la trypsine.

25

Exemple 2 selon l'invention

Fabrication de microparticules de diamètre moyen 15 µm à partir d'HSA et de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est reproduit en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide.

30 On obtient des microparticules sphériques de diamètre moyen proche de 15 µm. Cet exemple montre que, pour des conditions d'émulsification données, on peut ajuster le diamètre des microparticules par le choix de la phase dispersante.

Exemple 3 selon l'inventionFabrication de microparticules de diamètre moyen 200 µm à partir d'ovalbumine et de PGA et contenant un colorant hydrosoluble.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est reproduit en remplaçant la sérum-albumine humaine par l'ovalbumine (LABOSI), utilisée à la même concentration (20 %) et en dissolvant dans la phase aqueuse du bleu patenté V à la concentration de 1 %. Le protocole de lavage est modifié : les microparticules sont lavées au cyclohexane. Elles sont ensuite débarrassées du solvant par évaporation sous vide, congelées et lyophilisées.

On obtient des microparticules sphériques, de couleur bleue, de diamètre moyen 200 µm. Elles résistent plus de 3 j à une incubation dans l'eau distillée, ou dans une solution de pH 1,2, ou dans une solution de pH 7,5. Les microparticules résistent au moins 24 h à la pepsine et sont lysées en 3 h par la trypsine.

Essai de stabilité dans l'eau distillée à 45°C

Les microcapsules qui viennent d'être obtenues en suspension dans l'eau distillée sont centrifugées et débarrassées du surmargeant. On prélève 1 g du culot de microcapsules ainsi essorées et on met cette prise d'essai en suspension dans 50 ml d'eau distillée stérile. Le flacon est bouché puis placé à l'étuve à 45°C. On observe que les microcapsules sont restées intactes après 2 mois 1/2 de séjour en étuve.

Exemple 4 selon l'inventionFabrication de microparticules de diamètre moyen 75 µm à partir d'ovalbumine et de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 3 est reproduit en remplaçant le myristate d'isopropyle par le chloroforme et en utilisant du polyéthylèneglycol 200 au lieu d'éthanol à 95 % pour préparer les solutions de soude et d'acide acétique.

On obtient des microparticules de diamètre moyen 75 µm.

30    Exemple 5 selon l'invention

Fabrication de microparticules de diamètre moyen 250 µm à partir d'hémoglobine et de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est reproduit en remplaçant la sérum-albumine humaine par l'hémoglobine de mouton (SIGMA), utilisée à la concentration de 15 % p/v.

On obtient des microparticules de couleur rouge vif, sphériques, de diamètre moyen  $250 \mu\text{m}$ , qui peuvent être lyophilisées. Ces microparticules sont détruites par la pepsine en 10 min, par la trypsine en 3 h 30.

Essai de stabilité dans l'eau distillée à 45°C

5 Dans les mêmes conditions d'essai de stabilité que celles décrites à l'exemple 3, on observe que les microcapsules sont intactes après 2 mois 1/2 de séjour à l'étuve à 45°C, à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 6 selon l'invention

10 Fabrication de microparticules de diamètre moyen  $50 \mu\text{m}$  à partir d'hémoglobine et de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 5 est reproduit en remplaçant le myristate d'isopropyle par le chloroforme.

On obtient des microparticules rouges de diamètre moyen  $50 \mu\text{m}$ .

15 C'est un autre exemple qui montre que, pour des conditions d'émulsification données, le diamètre des microparticules peut être ajusté par le choix de la phase hydrophobe dispersante.

Exemple 7 selon l'invention

20 Fabrication de microparticules de diamètre moyen  $250 \mu\text{m}$  à partir de fibrinogène et de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est reproduit en remplaçant la sérum-albumine humaine par le fibrinogène de boeuf (SIGMA), utilisé à la concentration de 6 % p/v.

25 On obtient des microparticules à contenu granuleux, de diamètre moyen  $250 \mu\text{m}$ , qui peuvent être lyophilisées. Ces microparticules résistent plus de 24 h à la pepsine, tandis qu'elles sont lysées en 3 h par la trypsine.

Essai de stabilité dans l'eau distillée à 45°C

En procédant dans les conditions d'essai de stabilité décrites à 30 l'exemple 3, on observe que les microcapsules sont intactes après 2 mois 1/2 de séjour à l'étuve à 45°C, à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 8 selon l'inventionFabrication de microparticules de catalase immobilisée par le PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est reproduit en remplaçant la sérum-albumine humaine par de la catalase de foie de boeuf (C-10 de SIGMA), utilisée à 5 la concentration de 20 % p/v.

On obtient des microparticules sphériques de diamètre moyen 75  $\mu\text{m}$ , donnant après lyophilisation une poudre aisément réhydratable.

Une pincée de cette poudre mise au contact d'eau oxygénée à 110 volumes produit instantanément un important dégagement gazeux sous forme 10 de multiples bulles.

Détermination de l'activité catalasique (Méthode de Feinstein, J. Biol. Chem., 1949, 180, p. 1197)

Une prise d'essai de 5 mg de microparticules lyophilisées est réhydratée par addition de 1 ml de tampon phosphate pH 7 et agitation magnétique 15 de 5 min à température ambiante (20°C). On ajoute 3 ml d'une solution de perborate de sodium préalablement titrée (par une solution de KMnO<sub>4</sub> 0,005M) à 88,46 mmol/l d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est stoppée après 30 s par addition de 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Le milieu est additionné de 1 ml d'acide trichloracétique à 20 % et filtré sur filtre 0,22  $\mu\text{m}$ . L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant est dosé sur une aliquote du filtrat 20 additionnée d'une goutte de MnCl<sub>2</sub> à 1 %, par une solution de KMnO<sub>4</sub> 0,005M.

Résultats (moyenne de 3 essais) :

Après 30 s, il ne reste dans le milieu que 34,17  $\mu\text{mol}$  de substrat sur les 265,37  $\mu\text{mol}$  initialement présentes.

Des essais effectués parallèlement avec la catalase pure dans les 25 mêmes conditions indiquent que, pour observer une activité comparable à celle de 5 mg de microparticules, il faut utiliser 1 ml d'une solution de catalase à 5 mg/40 ml (substrat résiduel après 30 s, moyenne de 3 essais : 37,5  $\mu\text{mol}$ ).

Ainsi, les 5 mg de microparticules lyophilisées, qui correspondent en fait à 4,762 mg de catalase mise en jeu dans la préparation, ont la même activité 30 que 0,125 mg de catalase pure n'ayant pas subi de lyophilisation. Ces résultats démontrent que le procédé de préparation de microparticules selon l'invention permet d'obtenir des microparticules présentant une activité enzymatique intéressante.

Exemple 9 selon l'invention

Si on applique le protocole de fabrication de microparticules décrit à 35 l'exemple 8 mais en utilisant au lieu d'une solution de soude dans l'éthanol à 95 %

une solution de soude dans le polyéthylèneglycol 200 (PEG 200) à la même concentration, et, au lieu d'une solution d'acide acétique dans l'éthanol à 95 %, une solution d'acide acétique dans le PEG 200 à la même concentration, on obtient également des microparticules stables ( $30 \mu\text{m}$ ). Si on détermine l'activité 5 catalasique d'un échantillon de 5 mg de ces microparticules lyophilisées dans les conditions décrites à l'exemple 8, on constate qu'une seule goutte de  $\text{KMnO}_4$  0,005 M suffit à colorer le contenu de la fiole de dosage : tout  $\text{H}_2\text{O}_2$  a donc été décomposé en 30 s.

Ainsi, lorsque les solutions des agents alcalin et acide sont préparées 10 avec un PEG au lieu d'éthanol, on limite la dénaturation de l'enzyme, ce qui permet de préserver une plus grande part de l'activité enzymatique.

#### Exemple 10 selon l'invention

##### Fabrication de microparticules à partir de gélatine et de PGA.

15 Préparation de la phase aqueuse : on prépare, à la température de 40°C, 8 ml d'une solution aqueuse de gélatine type B, bloom 150, à la concentration de 10 %, et de PGA à la concentration de 1 %.

Emulsification : dans un récipient thermostaté à 40°C, 6 ml de cette 20 phase aqueuse sont émulsionnés dans 40 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % de Span 85 et préchauffés à la température de 40°C (vitesse d'agitation : 2 000 tr/min).

L'alcalinisation, la neutralisation et les lavages sont ensuite effectués comme décrit dans l'exemple 1. Les microparticules apparaissent comme des sphères de diamètre moyen 1 mm. Après lyophilisation, elles donnent une poudre 25 blanche qui se réhydrate facilement.

#### Exemple 11 selon l'invention

##### Fabrication de microparticules à partir d'atélocollagène et chondroïtine sulfate et de PGA.

30 Préparation de la phase aqueuse : une solution à 1,6 % d'atélocollagène et 0,6 % de chondroïtine sulfate dans un tampon phosphate pH 7,4 est additionnée de PGA à la concentration de 0,7 %. Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite appliqué à cette solution aqueuse.

On obtient des microparticules de diamètre moyen  $600 \mu\text{m}$ .

Exemple 12 selon l'inventionFabrication de microparticules à partir d'atélocollagène et chondroïtine sulfate et de PGA avec traitement ultérieur au CaCl<sub>2</sub>.

Le protocole décrit à l'exemple 11 est reproduit en ajoutant, 15 min  
5 après l'ajout de la solution alcoolique acide, 40 ml d'éthanol à 95 % contenant 2 % de Tween 20 et 2 % de CaCl<sub>2</sub>. L'agitation est poursuivie pendant 15 min, puis les microparticules sont séparées par centrifugation et lavées comme décrit à l'exemple 1.

On obtient des microparticules à contenu granuleux de diamètre  
10 moyen 300 µm.

Exemple 13 selon l'inventionFabrication de microparticules à partir d'atélocollagène et chondroïtine sulfate et de PGA et contenant des bulles d'air.

15 Préparation de la phase aqueuse : à une solution à 1,6 % d'atélocollagène et 0,6 % de chondroïtine sulfate dans un tampon phosphate pH 7,4, on ajoute du PGA à la concentration de 0,7 % et on mélange par agitation mécanique à faible vitesse (300 tr/min) pendant 6 min.

20 Incorporation d'air : de manière à incorporer des bulles d'air à la phase aqueuse, la vitesse d'agitation est augmentée à 5 000 tr/min et maintenue à cette valeur pendant 3 min, ce qui produit une mousse.

Emulsification : 24 ml de la mousse sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans 80 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % de Span 85, avec une vitesse d'agitation de 2 000 tr/min.

25 Les opérations d'alcalinisation et d'acidification sont ensuite effectuées comme décrit dans l'exemple 1, mais en utilisant 8 ml des solutions alcooliques alcaline et acide. Les lavages sont effectués comme décrit dans l'exemple 1.

30 On obtient des microparticules de diamètre moyen 600 µm, de couleur beige, translucides, contenant des bulles d'air visibles (20 à 30 environ par microparticule), et flottant à la surface de l'eau. Après lyophilisation, les microparticules une fois réhydratées apparaissent au microscope chargées de bulles d'air. Elles flottent sur l'eau pendant au moins 9 h. Après 48 h, les microparticules ont sédiménté. Les bulles d'air ne sont plus présentes dans les microparticules, qui conservent, à la place qu'elles occupaient, des cavités circulaires lisses visibles au 35 microscope optique à contraste de phase interférentiel.

**Exemple 14 selon l'invention****Fabrication de microparticules à partir de lait entier et de PGA et contenant un pigment insoluble en suspension.**

Préparation de la phase aqueuse : on dissout 60 mg de PGA dans 6 ml  
5 de lait liquide entier par agitation. On disperse dans cette solution 60 mg de colorant rouge insoluble, le RED DC 30, par agitation.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant comme phase aqueuse 6 ml de la solution précédente.

On obtient des microparticules de couleur rouge, de diamètre moyen  
10 300 µm. Les microparticules sont intactes après lyophilisation.

**Exemple 15 selon l'invention****Fabrication de microparticules à partir de lait écrémé en poudre et de PGA et contenant de l'huile d'olive émulsionnée dans la phase aqueuse.**

15 Préparation de la phase aqueuse : on dissout 4 g de lait en poudre écrémé dans 16 ml d'eau distillée par agitation de 3 min. 160 mg de PGA sont ensuite dissous dans cette solution par agitation de 6 min.

Dans la solution obtenue utilisée comme phase dispersante, on émulsionne 3 ml d'huile d'olive utilisée comme phase dispersée, par agitation à 5 000 tr/min.  
20

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant comme phase aqueuse 12 ml de l'émulsion précédente et en doublant tous les volumes des différents réactifs. Les microparticules sont lavées au moyen d'eau distillée additionnée de 2 % de Tween 20, puis avec de l'eau distillée.

25 Après lavage, on obtient des microparticules bien sphériques, de diamètre moyen 400 µm. L'examen microscopique montre un contenu granuleux au sein duquel on distingue les gouttelettes d'huile sous forme de très petites sphères réfringentes. Les microparticules sont intactes après lyophilisation.

**Exemple 16 selon l'invention****Fabrication de microparticules à partir de lait écrémé en poudre et de PGA et contenant de l'huile essentielle de menthe poivrée émulsionnée dans la phase aqueuse.**

Préparation de la phase aqueuse : on dissout 1,6 g de lait en poudre  
35 écrémé dans 8 ml d'eau distillée par agitation de 3 min. 80 mg de PGA sont ensuite dissous dans cette solution par agitation de 6 min.

Dans la solution obtenue utilisée comme phase dispersante, on émulsionne 1 ml d'huile essentielle de menthe poivrée utilisée comme phase dispersée, par agitation à 5 000 tr/min.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant 5 comme phase aqueuse 6 ml de l'émulsion précédente. L'alcalinisation est réalisée par addition de 2 ml d'une solution de potasse à 2,8 % dans l'éthanol à 95 %, et l'acidification, par addition de 2 ml d'une solution à 28,1 % d'acide citrique hydraté à 1 mol H<sub>2</sub>O dans l'éthanol à 95 %. Les microparticules sont lavées comme décrit à l'exemple 15.

10 On obtient des microparticules bien sphériques, de diamètre moyen 150 µm. L'examen microscopique montre un contenu granuleux au sein duquel on distingue les gouttelettes d'huile essentielle sous forme de très petites sphères refringentes.

15 Exemple 17 selon l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'un concentré de protéines du lactosérum et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 16 ml d'eau distillée, on dissout 160 mg de PGA, et 3,2 g de concentré de protéines du lactosérum (Prosobel S65E, 20 Bel Industries).

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant comme phase aqueuse 12 ml de la solution précédente et en doublant tous les volumes des différents réactifs.

On obtient des microparticules sphériques à contenu granuleux, de 25 diamètre moyen 500 µm, qui sont intactes après lyophilisation.

Exemple 18 selon l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'hexaméthylénediamine (HMD Fluka) et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : on dissout 16 mg d'HMD dans 4 ml 30 de tampon phosphate pH 5,9. On dissout séparément 200 mg de PGA dans 5 ml de tampon phosphate pH 5,9. On mélange par agitation de 1 min les 4 ml de la solution d'HMD avec 4 ml de la solution de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant 35 comme phase aqueuse 6 ml de la solution précédente et en remplaçant le myristate d'isopropyle par du chlorure de méthylène.

On obtient des microparticules transparentes, de diamètre moyen 400 µm, qui sont intactes après lyophilisation. Elles résistent plus de 24 h à la trypsine comme à la pepsine.

5    Exemple 19 selon l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'ovalbumine et de pectine.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 240 mg de pectine de pomme (FLUKA, estérification : 70 à 75 %), et 800 mg d'ovalbumine.

10      Puis le protocole décrit dans l'exemple 1 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente, en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide, et en doublant les volumes des solutions alcaline et acide.

On obtient des microparticules de taille moyenne 200 µm, à contenu granuleux.

15

Exemple 20 selon l'invention

Fabrication de microparticules à partir de lait en poudre et de pectine.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 240 mg de pectine de pomme, et 800 mg de lait en poudre écrémé GLORIA.

20      Puis, le protocole décrit dans l'exemple 1 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente, en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide et en doublant les volumes des solutions alcaline et acide. On obtient des microparticules sphériques de taille comprise entre 2 µm et 300 µm qui peuvent être lyophilisées.

25

Exemple 21 selon l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'alcool polyvinyle (PVA) et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 30 à 40°C 80 mg de PVA (MERCK, degré d'hydrolyse : 98 %, poids moléculaire 72 000) et 320 mg de PGA.

Puis, le protocole décrit dans l'exemple 1 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente, et en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide.

35

On obtient des microparticules sphériques de taille moyenne 1,2 mm.

Exemple 22 selon l'inventionFabrication de microparticules à partir d'hydroxyéthylamidon (HEA) et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout  
5 1,472 g de Plasmastéril (Frésénius A.G.) correspondant à 1,28 g d'HEA, et 320 mg de PGA.

Puis le protocole décrit dans l'exemple 1 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente, et en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide.

10 On obtient des microparticules sphériques de taille moyenne 600 µm.

Exemple 23 selon l'inventionFabrication de microparticules à partir de carboxyméthylcellulose et de PGA.

15 Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 80 mg de CMC (CMC 7 LF, degré de substitution : 0,7, HERCULES) et 320 mg de PGA, par agitation magnétique de 15 min à 40°C.

Puis le protocole décrit dans l'exemple 1 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente.

20 On obtient des microparticules granuleuses de taille moyenne 1,8 mm.

Exemple 24 selon l'inventionFabrication de microcapsules à phase interne aqueuse à partir d'hydroxypropylcellulose en solution dans un liquide hydrophobe et de PGA en solution aqueuse.

25 Préparation de la phase aqueuse : dans 4 ml d'eau distillée, on dissout 80 mg de PGA.

Préparation de la phase hydrophobe : dans 20 ml de chloroforme, on dissout 300 mg d'hydroxypropylcellulose (Klucel EF, AQUALON).

30 Emulsification : 3 ml de la phase aqueuse sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans 20 ml de la phase hydrophobe par agitation à 2 000 tr/min pendant 5 min.

Puis l'alcalinisation et l'acidification sont effectuées comme décrit dans l'exemple 1, mais en utilisant 1 ml de solution alcoolique de soude et 1 ml de la 35 solution alcoolique d'acide acétique.

Les lavages sont effectués comme décrit dans l'exemple 1.

On obtient des microcapsules sphériques, de taille moyenne 70 µm. Après lyophilisation, les microcapsules sont intactes et se réhydratent rapidement en reprenant leur forme sphérique.

5    Exemple 25 selon l'invention

Fabrication de microcapsules à phase interne hydrophobe à partir d'hydroxypropylcellulose en solution dans un liquide hydrophobe et de PGA en solution aqueuse.

Préparation de la phase aqueuse : dans 40 ml d'eau distillée, on dissout  
10    800 mg de PGA.

Préparation de la phase hydrophobe : à 6 ml de chloroforme, on ajoute 2 ml d'une solution à 2 % de soude dans l'éthanol à 95 %. On dissout dans ce mélange 160 mg d'hydroxypropylcellulose (Klucel EF, AQUALON).

Emulsification : les 6 ml de la phase hydrophobe sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans 40 ml de la phase aqueuse par agitation à 2 000 tr/min.

Après 15 min, on ajoute 2 ml de solution alcoolique acide préparée comme décrit dans l'exemple 1. Après un nouveau temps de 15 min, les microcapsules sont centrifugées et lavées comme décrit à l'exemple 15.

20              On obtient des microcapsules sphériques, de taille moyenne 10 µm.

Exemple 26 selon l'invention

Fabrication de microcapsules à phase interne aqueuse à partir d'hexaméthylènediamine en solution dans un liquide hydrophobe et de PGA en solution aqueuse.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 160 mg de PGA.

Préparation de la phase hydrophobe : dans 40 ml de cyclohexane, on dissout 80 mg d'hexaméthylènediamine (FLUKA).

30              Emulsification : 6 ml de la phase aqueuse sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans 40 ml de la phase hydrophobe par agitation à 2 000 tr/min pendant 5 min.

Puis l'alcalinisation est effectuée comme décrit dans l'exemple 1. Après 15 min, l'acidification est réalisée par addition de 1 ml d'éthanol à 95 % renfermant 35    28,3 % v/v ml d'acide acétique. Les lavages sont effectués comme décrit dans l'exemple 1.

On obtient des microcapsules sphériques, de taille moyenne 5 µm.

**Exemple 27 selon l'invention**

5     Fabrication de microcapsules à phase interne huileuse à partir d'hexaméthylènediamine en solution dans un liquide hydrophobe et de PGA en solution aqueuse.

Préparation de la phase aqueuse : dans 40 ml d'eau distillée, on dissout 800 mg de PGA.

10    Préparation de la phase hydrophobe : dans 6 ml de cyclohexane additionnés de 2 ml d'éthanol à 95 %, contenant 2 % de soude, on dissout 16 mg d'hexaméthylènediamine.

Emulsification : 6 ml de la phase organique sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans 40 ml de la phase aqueuse par agitation à 2 000 tr/min.

15    Après 15 min, l'acidification et les lavages ultérieurs sont effectués comme décrit dans l'exemple 25.

On obtient des microcapsules, de taille moyenne 50 µm.

**Exemple 28 selon l'invention**

20    Fabrication de microcapsules contenant du myristate d'isopropyle à partir de lait entier et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 40 ml de lait entier, on dissout 400 mg de PGA.

25    Préparation de la phase hydrophobe : à 3 ml de myristate d'isopropyle, on ajoute 3 ml de la solution alcoolique de soude préparée comme décrit dans l'exemple 1, et on mélange par agitation magnétique pendant 2 min.

Emulsification : les 6 ml de la phase hydrophobe sont émulsionnés à l'état de phase dispersée dans les 40 ml de la phase aqueuse par agitation à 2 000 tr/min.

30    Après 15 min, on procède à la neutralisation par ajout de 3 ml de solution alcoolique acide préparée comme décrit à l'exemple 1.

Après 15 min, le milieu réactionnel est dilué par addition de 40 ml d'eau distillée et agitation pendant 1 min. Ensuite les microcapsules sont lavées plusieurs fois à l'eau distillée.

On obtient des microcapsules sphériques, de taille moyenne 5 µm.

Exemple 29 selon l'inventionFabrication de microcapsules contenant du myristate d'isopropyle à partir d'ovalbumine et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 40 ml d'eau distillée, on dissout  
5 4 g d'ovalbumine et 400 mg de PGA.

Préparation de la phase hydrophobe : à 8 ml de myristate d'isopropyle, on ajoute 4 ml de la solution alcoolique de soude préparée comme décrit dans l'exemple 1, et on mélange par agitation magnétique pendant 2 min.

Emulsification : les 12 ml de la phase hydrophobe sont émulsionnés à  
10 l'état de phase dispersée dans les 40 ml de la phase aqueuse par agitation à 2 000 tr/min.

Après 15 min, on procède à la neutralisation par ajout de 4 ml d'une solution acide préparée comme décrit à l'exemple 1. Après 15 min, on procède aux lavages comme décrit dans l'exemple 15.

15 On obtient des microcapsules sphériques de taille moyenne 15  $\mu\text{m}$ . Lorsqu'on écrase les microcapsules en exerçant une pression sur la lamelle d'observation microscopique, on voit au microscope la gouttelette huileuse sortir de la membrane.

20 Exemple 30 selon l'invention

Fabrication de microcapsules à partir de jaune d'oeuf et de PGA

La préparation de la phase aqueuse est réalisée en dissolvant 80 mg de PAG dans 8 ml de jaune d'oeuf par agitation.

25 Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant comme phase aqueuse 6 ml de la solution précédente.

On obtient des microcapsules de couleur beige, de taille moyenne 300  $\mu\text{m}$  après avoir été congelées et lyophilisées. Après lyophilisation, la réhydratation de la poudre obtenue de microcapsules montre que les microcapsules sont intactes et reprennent leur forme sphérique.

30

Exemple 31 selon l'inventionFabrication de microcapsules à phase interne aqueuse à partir de protéine greffée d'une longue chaîne carbonée, par exemple le Lamepon S<sup>®</sup> en solution dans un liquide hydrophobe et de PGA en solution aqueuse

35 La préparation de la phase aqueuse est réalisée en dissolvant 160 mg de PGA dans 8 ml d'eau distillée.

La préparation de la phase hydrophobe est réalisée en dissolvant 3 g d'une protéine greffée d'une longue chaîne carbonée, ou polyamide disponible dans le commerce, par exemple celle connue sous le nom commercial Lamepon S®, produit disponible auprès de la société LASERSON et SABETAY bien connu à l'homme de l'art, dans 30 ml de chloroforme.

On réalise l'émulsification en émulsionnant 6 ml de la phase aqueuse à l'état de phase dispersée dans 30 ml de phase hydrophobe par agitation à 2 000 tr/min pendant 5 min.

On procède ensuite à l'alcalinisation, à l'acidification et au lavage comme décrit dans l'exemple 1.

On obtient des microcapsules sphériques de taille moyenne 30 µm.

#### Exemple 32 selon l'invention

##### Fabrication de microcapsules à partir de chitosan et de PGA

Pour la préparation de la phase aqueuse, on dissout 400 mg de chitosan, par exemple le produit commercialement disponible sous la référence commerciale Seacur 143 de la société PROTAN, dans 10 ml d'acide acétique 1M, puis on ajuste le pH à 5,6 avec de la soude et on dissout ensuite dans cette solution 100 mg de PGA.

Le protocole décrit à l'exemple 1 est ensuite reproduit en utilisant la solution précédente comme phase aqueuse.

On obtient un volumineux sédiment formé de microcapsules à membrane nette, de diamètre compris entre 50 et 500 µm.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une réaction de transacylation entre un polysaccharide 5 porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée, telle qu'une protéine ou une substance polyhydroxylée, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan ou une protéine pour la fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les 10 microparticules, en particulier les microcapsules, contiennent un principe actif cosmétique, pharmaceutique, alimentaire ou activité biologique telle qu'une protéine, en particulier une enzyme ou l'hémoglobine.
3. Microparticules, en particulier microcapsules, caractérisées en ce 15 qu'elles présentent une paroi constituée du produit de réaction entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et une substance polyaminée, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, ou une substance polyhydroxylée, telle qu'un polysaccharide, en particulier ayant un diamètre compris entre environ 0,1 µm et environ 5 000 µm.
4. Microparticules selon la revendication 3, caractérisées en ce que 20 dans le cas d'une paroi formée par le produit de réaction d'un polysaccharide estérifié et d'une polyamine, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine tel que chitosan, ou une protéine, le rapport en polysaccharide estérifié/polyamine est compris entre 0,4 et 60 % en poids.
5. Microparticules selon la revendication 3, caractérisées en ce que 25 dans le cas d'une paroi constituée du produit de réaction d'un polysaccharide estérifié et d'une substance polyhydroxylée, telle qu'un polysaccharide, le rapport polysaccharide estérifié/substance polyhydroxylée est compris entre 5 et 300 % en poids.
6. Microparticules selon une des revendications 3 à 5, caractérisées en ce que le polysaccharide estérifié précité comprend au moins 50 % de ses groupes carboxyliques estérifiés. 30
7. Microparticules selon une des revendications 3 à 6, caractérisées en ce que le polysaccharide estérifié précité est choisi parmi l'alginate de propylène-glycol et les pectines. 35

8. Microparticules selon une des revendications 2 à 7, caractérisées en ce qu'elles contiennent un principe actif cosmétique, pharmaceutique, alimentaire ou une substance douée d'une activité biologique telle qu'une protéine, par exemple une enzyme ou l'hémoglobine.

5        9. Procédé de fabrication de microparticules, en particulier de micro-capsules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

10      a) on prépare une solution aqueuse sensiblement neutre contenant un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, une substance polyaminée, telle qu'un polysaccharide porteur de groupements amine, tel que le chitosan, ou une protéine, ou une substance polyhydroxylée, telle qu'un polysaccharide ;

15      b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel le polysaccharide estérifié et la substance polyaminée ou polyhydroxylée sont essentiellement insolubles ;

15      c) on mélange le liquide hydrophobe et la solution aqueuse pour former une émulsion ;

20      d) on ajoute soit au liquide hydrophobe soit à l'émulsion une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ;

20      e) après une période de temps prédéterminée pour réaliser une réaction de transestérification, en formant ainsi des microparticules, en particulier des microcapsules, on neutralise l'émulsion de préférence en ajoutant à l'émulsion une solution d'une substance acide dans un milieu organique miscible à la phase aqueuse, de manière à neutraliser et stabiliser les microparticules, en particulier les microcapsules formées.

25      10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans le cas où la solution aqueuse forme une phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue, la solution de substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse est ajoutée à l'émulsion.

30      11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans le cas où la phase hydrophobe forme une phase dispersée dans la solution aqueuse neutre formant la phase continue, la solution de substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse est ajoutée au liquide hydrophobe.

35      12. Procédé de préparation de microparticules, en particulier de micro-capsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :

35      a) on prépare une solution aqueuse neutre d'un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés ;

- b) on prépare une solution hydrophobe d'une substance polyaminée telle que par exemple un polysaccharide porteur de groupement amine, tel que le chitosan ou une protéine, en particulier une protéine partiellement hydrolysée ou non, qui peut être greffée de longues chaînes hydrocarbonées, de préférence en 5  $C_{10}-C_{30}$ , ou une alkylènediamine, ou d'une substance polyhydroxylée telle que par exemple un polysaccharide, l'hydroxypropylcellulose, dans un liquide hydrophobe dans lequel le polysaccharide estérifié est essentiellement insoluble et on ajoute à cette solution une solution d'un agent alcalin dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ;
- 10 c) on forme une émulsion de ce mélange utilisé comme phase dispersée dans la solution aqueuse neutre du polysaccharide estérifié formant la phase continue, et on laisse se développer la réaction de transacylation à la surface des gouttelettes dispersées par diffusion des ions alcalins jusqu'à l'interface ;
- d) après réaction pendant une période de temps prédéterminée, on 15 ajoute au milieu réactionnel une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ou dans l'eau, de manière à neutraliser et ainsi stabiliser les microparticules, en particulier les microcapsules formées.
13. Procédé de fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :
- 20 a) on prépare une solution aqueuse neutre d'un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés ;
- b) on prépare une solution d'une substance polyaminée ou d'une substance polyhydroxylée dans un liquide hydrophobe, dans lequel le polysaccharide estérifié est essentiellement insoluble ;
- 25 c) on forme une émulsion de la solution aqueuse utilisée comme phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue ;
- d) on ajoute à l'émulsion une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse, de manière à déclencher la réaction interfaciale de transacylation et former ainsi des microparticules, en particulier des 30 microcapsules ;
- e) après réaction pendant une période de temps prédéterminée, on ajoute à l'émulsion une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse de manière à neutraliser et ainsi stabiliser les microparticules, en particulier les microcapsules.
- 35 14. Procédé selon une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que les microparticules, en particulier les microcapsules une fois séparées du milieu

réactionnel sont placées dans une solution calcique aqueuse ou alcoolique de manière à déclencher une réaction entre les groupes fonctionnels du polysaccharide estérifié et les ions calcium.

15. Procédé selon une des revendications 9 à 14, caractérisé en ce que
- 5 la substance polyaminée précitée est choisie parmi un polysaccharide porteur de groupement amine, tel que le chitosan, une protéine partiellement hydrolysée ou non, qui peut être greffée de longues chaînes hydrocarbonées, de préférence en C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>, une protéine contenant des groupements amine libres, de préférence choisie parmi les groupes consistant de lait, de mélanges d'atélocollagène et de
- 10 glycosaminoglycannes, d'albumine comme la sérumalbumine, l'ovalbumine, l'alpha-lactalbumine, des globulines, le fibrinogène, la caséine, des glutélines, qui de préférence auront été dégradés, des scléroprotéines solubilisées, le collagène, l'atélocollagène, la gélatine, l'hémoglobine, des enzymes telles que la catalase, le lait entier ou écrémé totalement ou partiellement, le lait en poudre, le lait
- 15 condensé, les protéines du lactosérum, l'oeuf entier, le jaune d'oeuf ; ou une diamine en particulier une alkylènediamine de préférence en C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> telle que l'éthylènediamine, la triméthylènediamine, la tétraméthylènediamine, la pentaméthylènediamine, l'examéthylènediamine, une diamine à noyau aromatique tel que m-phénylènediamine, p-phénylènediamine, une amine
- 20 acyclique contenant un atome d'azote dans le cycle telle que la pipérazine, une alkylènepolyamine telle que la tétraéthylènepentamine.

16. Procédé selon une des revendications 9 à 15, caractérisé en ce que le polysaccharide estérifié précité est un polysaccharide hydrophile porteur de groupements carboxyliques dont au moins 50 % sont estérifiés.

- 25 17. Procédé selon une des revendications 9 à 16, caractérisé en ce que le polysaccharide estérifié précité est choisi parmi l'alginate de propylèneglycol et les pectines.

- 30 18. Procédé selon une des revendications 9 à 17, caractérisé en ce que la substance polyhydroxylée précitée est choisie parmi un polysaccharide ou dérivé de polysaccharide tel que l'amidon ou l'amidon partiellement hydrolysé, l'hydroxyéthylamidon, le carboxyméthylamidon, l'alginate de sodium, la gomme guar, la gomme arabique, la gomme adragante, les dérivés de cellulose tels que l'hydroxypropylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'éthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, ou un polyalcool tel que l'alcool
- 35 polyvinyle, un alkylènepolyglycol en particulier en C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, tel que l'éthylènepolyglycol, le 1,4-butanediol, l'examéthylènepolyglycol, le glycérol.

19. Procédé selon une des revendications 9 à 18, caractérisé en ce que le liquide hydrophobe précité est choisi parmi le myristate d'isopropyle, l'huile de paraffine, le cyclohexane, le chloroforme et le dichlorométhane, des glycérines naturelles ou synthétiques, pures ou en mélanges, des huiles végétales telles qu'huile d'arachide, huile d'olive, huile de colza, des esters d'acides gras et de divers alcools tels qu'oléate de méthyle ou d'éthyle, utilisables seuls ou en mélanges.

5        20. Procédé selon une des revendications 9 à 19, caractérisé en ce que l'émulsion précitée est réalisée en présence d'un tensioactif, en particulier un ester de sorbitanne ou une lécithine, ou un polysorbate.

10        21. Procédé selon une des revendications 9 à 20, caractérisé en ce que le liquide organique alcalin miscible à la phase aqueuse est une solution de soude ou de potasse dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol utilisé pur ou renfermant 5 à 10 % d'eau, ou encore un polyol tel que le glycérol ou un polyéthylène-glycol, de préférence la solution contient entre 0,5 et 2 % en p/v de soude dans l'éthanol à 95 %.

15        22. Procédé selon une des revendications 9 à 21, caractérisé en ce que le liquide organique acide miscible à la phase aqueuse est une solution d'un acide organique monocarboxylique ou polycarboxylique porteur ou non de fonction alcool comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide succinique, l'acide malique, ou d'un acide minéral comme l'acide chlorhydrique, dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, pur ou renfermant 5 à 10 % d'eau, ou encore dans un polyol tel que le glycérol ou un polyéthylèneglycol, de préférence la solution acide est constituée d'éthanol à 95 % contenant entre 1 et 25        10 % (v/v) d'acide acétique, de préférence entre 7 et 8 %.

20        23. Procédé selon une des revendications 9 à 22, caractérisé en ce que les microparticules, en particulier les microcapsules contiennent une mousse, par exemple formée de bulles de gaz tel que l'air.

25        24. Procédé selon l'une des revendications 9 à 23, caractérisé en ce que les microparticules, en particulier microcapsules, contiennent une phase aqueuse ou une phase hydrophobe.

30        25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la phase aqueuse ou la phase hydrophobe contenue dans les microparticules, en particulier les microcapsules, contient un ou plusieurs principes actifs à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion, en particulier une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

26. Composition telle que composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, ou enzymatique, caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules, en particulier des microcapsules, présentant une paroi constituée du produit de réaction d'une substance polyaminée ou polyhydroxylée avec un polysaccharide 5 porteur de groupements carboxyliques estérifiés, en particulier telles que définies à l'une quelconque des revendications 3 à 8, ou telles qu'obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 25.

27. Composition selon la revendication 26, caractérisée en ce que les microparticules, en particulier les microcapsules contiennent une phase aqueuse ou 10 une phase hydrophobe.

28. Composition selon la revendication 27, caractérisée en ce que la phase aqueuse ou la phase hydrophobe contenue dans les microparticules, en particulier les microcapsules, contient un ou plusieurs principes actifs à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion, en particulier une ou plusieurs substances 15 d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 B01J13/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 B01J G03C C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB,A,962 483 (AGFA) 1 July 1964 ---	
A	GB,A,1 135 856 (ALGINATE INDUSTRIES) 8 September 1966 ---	
A	GB,A,768 309 (HENKEL) 13 February 1957 ---	
A	FR,A,2 444 497 (MARS) 18 July 1980 cited in the application ---	
A	FR,A,2 527 438 (CNRS) 2 December 1983 cited in the application ---	
A	GB,A,2 145 992 (DAMON BIOTECH INC.) 11 April 1985 --- -/-	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 1993

Date of mailing of the international search report

05. 11. 93

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

## Authorized officer

MEERTENS, J

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/FR 93/00792****C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p><b>DATABASE WPI</b> Week 8724, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-167571 &amp; JP,A,62 100 534 (FUJI SPINNING KK) 11 May 1987 see abstract</p> <p>-----</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/FR 93/00792

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB-A-962483		BE-A-	612782	
		CH-A-	426477	
		CH-A-	434728	
		DE-B-	1254346	
		FR-A-	1310992	
		NL-A-	273693	
		US-A-	3378373	
-----	-----	-----	-----	-----
GB-A-1135856		US-A-	3503769	31-03-70
-----	-----	-----	-----	-----
GB-A-768309		NONE		
-----	-----	-----	-----	-----
FR-A-2444497	18-07-80	GB-A,B	2040863	03-09-80
		US-A-	4569844	11-02-86
		CA-A-	1148800	28-06-83
-----	-----	-----	-----	-----
FR-A-2527438	02-12-83	EP-A,B	0095968	07-12-83
		JP-C-	1742095	15-03-93
		JP-B-	4024091	24-04-92
		JP-A-	58214336	13-12-83
		US-A-	4780321	25-10-88
-----	-----	-----	-----	-----
GB-A-2145992	11-04-85	AU-B-	563653	16-07-87
		AU-A-	3263484	07-03-85
		BE-A-	900469	17-12-84
		CA-A-	1245984	06-12-88
		CH-A-	664472	15-03-88
		DE-A,C	3432143	21-03-85
		FR-A,B	2551455	08-03-85
		JP-A-	60075326	27-04-85
		NL-A-	8402671	01-04-85
		SE-A-	8404343	02-03-85
		US-A-	4803168	07-02-89
-----	-----	-----	-----	-----

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00792

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 5 B01J13/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 B01J G03C C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GB,A,962 483 (AGFA) 1 Juillet 1964 ---	
A	GB,A,1 135 856 (ALGINATE INDUSTRIES) 8 Septembre 1966 ---	
A	GB,A,768 309 (HENKEL) 13 Février 1957 ---	
A	FR,A,2 444 497 (MARS) 18 Juillet 1980 cité dans la demande ---	
A	FR,A,2 527 438 (CNRS) 2 Décembre 1983 cité dans la demande ---	
A	GB,A,2 145 992 (DAMON BIOTECH INC.) 11 Avril 1985 --- -/-	

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 Octobre 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.11.93

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 581 8 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

MEERTENS, J

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00792

## C(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visées
A	<p>DATABASE WPI  Week 8724,  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 87-167571  &amp; JP,A,62 100 534 (FUJI SPINNING KK) 11  Mai 1987  voir abrégé</p> <p>-----</p>	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. de Internationale-No

PCT/FR 93/00792

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-962483		BE-A- 612782 CH-A- 426477 CH-A- 434728 DE-B- 1254346 FR-A- 1310992 NL-A- 273693 US-A- 3378373	
GB-A-1135856		US-A- 3503769	31-03-70
GB-A-768309		AUCUN	
FR-A-2444497	18-07-80	GB-A,B 2040863 US-A- 4569844 CA-A- 1148800	03-09-80 11-02-86 28-06-83
FR-A-2527438	02-12-83	EP-A,B 0095968 JP-C- 1742095 JP-B- 4024091 JP-A- 58214336 US-A- 4780321	07-12-83 15-03-93 24-04-92 13-12-83 25-10-88
GB-A-2145992	11-04-85	AU-B- 563653 AU-A- 3263484 BE-A- 900469 CA-A- 1245984 CH-A- 664472 DE-A,C 3432143 FR-A,B 2551455 JP-A- 60075326 NL-A- 8402671 SE-A- 8404343 US-A- 4803168	16-07-87 07-03-85 17-12-84 06-12-88 15-03-88 21-03-85 08-03-85 27-04-85 01-04-85 02-03-85 07-02-89